

# 母体铅暴露对仔鼠肾脏中 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响

李宁, 李丽, 崔灿, 张平安, 乔明武, 赵秋艳, 宋莲军

(河南农业大学食品科学技术学院, 河南郑州 450002)

**摘要:** 为了探讨母体铅暴露对仔鼠肾脏中 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的影响。采用自由饮水模式建立铅暴露动物模型, 将 40 只雌性小鼠自妊娠第 1 d 开始经饮水染铅(1.0 g/L、5.0 g/L 和 10.0 g/L, 对照组饮蒸馏水)至仔鼠出生后 21 d, 分别测定其血液和肾脏组织中铅的含量, 然后取其肾脏组织, 通过实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)的方法检测 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达情况。21 d 仔鼠血液中铅水平明显高于对照组( $p < 0.05$ ); 低、中和高剂量铅暴露组仔鼠肾脏组织中 MMP-2 mRNA 的表达明显高于对照组( $p < 0.05$ ), 铅暴露组仔鼠肾脏组织中 MMP-2 mRNA 的表达与对照组相比差异不显著( $p > 0.05$ )。与对照组相比, 染毒组仔鼠肾脏内 MMP-9 mRNA 的表达明显高于对照组, 且随染毒剂量增加, 表达量增加, 差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。母体铅暴露使铅在仔鼠体内蓄积, 可能通过增强仔鼠肾脏中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达进而造成肾脏损伤, 引起神经毒性。

**关键词:** MMP-2; 铅暴露; 肾脏; 小鼠

文章编号: 1673-9078(2017)4-1-5

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.001

## Effect of Maternal Lead Exposure on MMP-2 and MMP-9 mRNA Expression in the Kidneys of Mouse Offspring

LI Ning, LI Li, CUI Can, ZHANG Ping-an, QIAO Ming-wu, ZHAO Qiu-yan, SONG Lian-jun

(College of Food Science and Technology, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** To explore the effect of maternal lead exposure on matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 mRNA expression in the kidney of mouse offspring, an animal model was established using lead-contaminated drinking water. A total of 40 female mice were given free access to water containing lead acetate solutions at dosages of either 1.0 g/L, 5.0 g/L, or 10.0 g/L from day 1 of pregnancy to postnatal day 21. A control group was given distilled water. The contents of lead in blood and kidneys were measured, and the kidney tissues were collected to detect the expression of MMP-2 and MMP-9 mRNAs by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR). The results showed that compared with the control group, the lead levels in the blood and kidneys of 21-day-old mouse pups in the lead-treated groups were significantly higher ( $p < 0.05$ ). Real-time PCR showed that the expression of MMP-2 mRNA in the kidneys of low, medium, and high lead exposure groups was higher than that of the control group ( $p < 0.05$ ), but no significant differences were found between the expression of MMP-2 mRNA in the kidneys of the lead exposure group and those of the control group ( $p > 0.05$ ). The MMP-9 mRNA expression in kidneys from the lead-exposed groups was significantly higher than that of the control group; the expression level increased with increasing dose, and the difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ). Maternal lead exposure could induce lead accumulation in the mouse offspring, and kidney damage and neurotoxicity could be caused, most likely due to the enhancement of MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in the kidneys of the offspring.

**Key words:** matrix metalloproteinases-2; lead exposure; kidney; mouse

铅是一种重金属毒物, 近年来, 对铅中毒深入研究的大量资料表明, 铅通过呼吸系统、神经系统和肾

收稿日期: 2016-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201878、U1204804); 中国博士后基金项目(2015M572109); 河南省博士后基金项目(2014049)

作者简介: 李宁, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事营养与食品卫生研究

功能等方面对动物机体健康造成不利影响<sup>[1,2]</sup>。肾脏是铅的毒性作用重要靶器官之一, 铅在极低浓度便可对人体多个系统产生毒害。铅中毒可引起肾脏损害, 导致肾脏疾病的发展可分为三个阶段, 早期以肾小管功能障碍为主, 表现为间质性肾炎。中期可能会出现肾小管发生萎缩, 肾小球的滤过率低和间质发生纤维化的特征, 主要特点为慢性肾功能衰竭。在早期, 肾小

管发生功能改变具有可逆性,但可能非常快地发展成不可逆性的肾小管出现萎缩,而且预后情况也不良<sup>[3]</sup>。

基质金属蛋白酶类(MMPs)是调节细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的最重要的酶系<sup>[3]</sup>,占细胞外基质降解酶总活性的70%以上。目前MMPs主要分为间质胶原酶类(包括MMP-1和MMP-2等),IV型胶原酶/明胶酶类(包括MMP-2和MMP-9等),基质分解素(包括MMP-3和MMP-10),能降解弹性纤维、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等基质糖蛋白和蛋白多糖的核心蛋白。MMP-2和MMP-9是分子质量分别为72 ku和92 ku中性蛋白酶,是基质金属蛋白酶家族的主要成员,对纤维连接蛋白、胶原IV和胶原V有重要作用<sup>[5]</sup>。MMP-9的蛋白组成包括信号肽域、前肽域、催化域、锌离子结合位点、纤维粘连蛋白样功能域和IV型胶原样功能域,其中IV型胶原样功能域为MMP-9所特有。IV型胶原是粥样斑块基底膜和纤维的重要组成部分,MMP-9可以高效降解IV型胶原<sup>[8]</sup>,在血管重生、炎症反应以及动脉粥样病变形成过程中起关键作用。在生理条件下MMP-9的活性受到严格调控,以酶原形式从细胞内分泌到细胞外后经一系列酶解过程被激活,但在血管或组织重构过程中活性明显上调<sup>[9]</sup>。近年来研究表明,MMP-9能够参与细胞外基质的降解。在仔鼠肾脏发育过程中,周围的间质细胞中有MMP-9基因的表达,而环境中的铅暴露也会对人体的肾脏有不同程度的损伤<sup>[4]</sup>。

铅暴露是否会影响肾脏中MMP-2和MMP-9 mRNA的表达,这方面的文献报道还不完善,为了深入研究有助于我们对其相关疾病发生的分子机制有更深层次了解,本研究通过运用Real-time PCR技术检测小鼠肾脏组织中MMP-2和MMP9 mRNA表达水平,进而分析铅暴露对肾脏中MMP-2和MMP9 mRNA的表达的影响,并探讨在铅诱导的肾脏毒性机制中的作用,为预后判断提供有价值的分子生物学指标和临床制定合理有效的综合治疗方案提供可靠的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

LabCycler PCR仪(德国SensoQuest公司);MDF-382E(N)型-80℃超低温冰箱(日本Sanyo公司);Milli-Q synthesis纯水仪(美国Millipore公司);高压蒸汽灭菌锅(HVE-50型)、101-2BS型电热鼓风干燥箱(天津市华北实验仪器有限公司);DK-8D型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司);UV 1601型紫外分光光度计(日本岛津公司);高速冷冻离心机(德国

5404AO906412型);LabCyclerPCR仪(德国SensoQuest公司);Real-time PCR扩增仪(Mx3000P<sup>TM</sup>型)、MDS-6型微波消解仪(上海新仪微波化学科技有限公司);TAS-990火焰原子吸收光谱仪(北京普析通用仪器有限公司);乙酸铅(天津市风船化学试剂科技有限公司);反转录试剂盒(郑州中原昕泰生物技术有限公司);异丙醇(天津市风船化学试剂科技有限公司);引物(北京天一辉远生物科技有限公司);Real-timePCR试剂盒(郑州中原昕泰生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物和处理

昆明SPF级雌小鼠40只,雄小鼠20只(河南省动物实验中心),合格证号:(SCXK(豫)2010-0002),温度18℃~22℃,湿度55%~60%,每天18:00以2:1雌雄合笼,次日8:00检查阴栓,不确定者做阴道涂片,发现精子为受孕第0 d。将孕鼠随机分为4组,每组10只,分笼饲养。染毒组自怀孕1 d起直至仔鼠出生21 d分别给予1 g/L(L组)、5 g/L(M组)、10 g/L(H组)乙酸铅水溶液,对照组(C组)饮用不含铅的蒸馏水。每组10只仔鼠,其中每窝取1~2只进行实验,于出生后第21 d解剖仔鼠取出全脑及肾脏等组织,放入液氮中,转存到-80℃冰箱冻存储存,仔鼠全血冻存到-20℃冰箱以备后用。

#### 1.2.2 仔鼠血液和肾脏组织中铅含量的测定

在仔鼠出生后的第21 d,将其头剪断,用针管吸取身体和头部的血液,打入高压灭菌过的EP管中,把仔鼠的身体放在冰盒上解剖取出肾脏,用TAS-990火焰原子吸收光谱仪测定经消化后血液和肾脏组织中铅的含量<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.3 RNA浓度与Real-time PCR反应体系

取50~100 mg对照组和低、中、高剂量染毒组肾脏组织分别置于已标编号匀浆器中,加入1 mL Trizol裂解液充分匀浆,室温静置5 min。将匀浆完成后的组织倒入EP管中,加入0.2 mL氯仿,振荡15 s,静置2 min,然后4℃转速12000 r离心15 min,取上清。往清液中加入0.5 mL异丙醇,室温静置10 min。然后4℃,转速12000 r离心10 min,弃上清。然后每管加入1 mL、75%乙醇,洗涤沉淀。4℃转速7500 r离心5 min,弃上清。加入适量的DEPC水溶解,将提取的RNA稀释50倍,即可测浓度。取1 μg所提取的RNA于紫外分光光度计下测量它的浓度和OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值维持在1.8~2.1之间,提取的RNA浓度较纯,可用于反转录。根据反转录质量要求最低为2 μg,算出反转录所需要加的RNA体积。

本实验所用小鼠的 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 序列以及  $\beta$ -actin 的基因序列, 委托北京天一辉远生物科技有限公司设计并合成, MMP-2(118 bp)上游 5'-ATCCCTGATAACCTGGATGC-3', 下游 5'-TTCCAAACTTCACGCTCTTG-3', MMP-9 (99 bp) 上游 5'-TCTTCTGGCGTGTGAGTTTC-3', 下游 5'-ACTGCA GGAGGTCGTAGGTC-3',  $\beta$ -actin 上游(218 bp)5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3' 下游 5'-ATGTCACGCA CGATTTCC-3'。按照试剂盒说明书中要求配制 70  $\mu$ L 体系的 PCR 反应液: 2 $\times$ SYBR Premixture 35  $\mu$ L, MMP-9 上游 1.4  $\mu$ L, MMP-9 下游 1.4  $\mu$ L, cDNA 3.5  $\mu$ L, ROX 1.4  $\mu$ L, 灭菌蒸馏水 27.3  $\mu$ L, 将上述所需试剂从 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中取出解冻, 完全解冻后用适宜移液枪反复抽送从而使试剂充分混匀, 离心过后按照上述顺序依次加入, 完成之后手持摇晃以使反应体系混合均匀, 离心。按照 25  $\mu$ L 分装到已标号的 EP 管中, 每个样品重复两次。然后 4  $^{\circ}$ C, 转速 12000 r 离心 30 s。然后在荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 以最小 Ct 值和最高荧光值为标准, 分别对循环条件、退火温度、引物浓度进行优化。经多次试验得到最优实验条件, 最终对引物稀释 10 倍, 最适退火温度为 65  $^{\circ}$ C, 采用三步法 Real-Time PCR, 反应参数为: 95  $^{\circ}$ C 起始模板变性 2 min; 95  $^{\circ}$ C 模板变性 30 s; 65  $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 40 个循环。数据读取由荧光定量 PCR 仪自动完成。反应结束后, 保存数据、溶解曲线及扩增曲线, 便于实验结果分析。按照上述方法在同样条件下使用  $\beta$ -actin 配制反应液进行实验。

### 1.2.4 仔鼠肾脏组织中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达

采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因在不同染毒组间的相对表达量<sup>[8]</sup>, 计算方法如下:  $\Delta Ct = Ct$  目的基因 -  $Ct$  内参基因, 对照组  $\Delta Ct$  的平均值记作  $\Delta Ct$  对照平均,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  样品 -  $\Delta Ct$  对照平均, 而  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  即为各组仔鼠肾脏组织中 MMP-2 mRNA 的相对表达量。

## 2 统计学分析

用 SPSS 18.0 统计软件对统计学分析所有数据进行处理。结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 用单因素方差分析对变量进行分析。检验显著性水平  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果与讨论

### 3.1 21日龄仔鼠血液和肾脏中铅浓度的结果

表 1 可知, 与对照组相比铅暴露组仔鼠血铅和肾脏铅水平明显增高, 且差异具有统计学意义( $p<0.05$ );

在染毒剂量之间, 随着染毒剂量增加, 无论血铅或者肾脏铅水平呈现出递增趋势且差异具有统计学意义( $p<0.05$ ); 血铅水平增长幅度与对照组相比较, 其它各染毒剂量组都依次类比都比较平缓; 肾脏铅 H 组与 M 组增长水平与 M 组与 L 组相比更高。导致这种现象的原因可能是仔鼠出生后身体在刚发育时期, 身体的各项机能或者是器官都比较脆弱, 其中肾脏功能就不是很强, 肾脏作为身体毒素的主要排泄器官, 在这个时期排泄毒素能力弱, 当毒素进入到仔鼠体内之后无法排除完全, 同时仔鼠在进入半断乳时期后, 也就是仔鼠出生 21 d, 该阶段仔鼠会不仅从母乳中吸收毒素铅, 还会从饮用水中吸取一部分铅, 这样就导致铅浓度比以往时候增高, 且染毒量越高, 毒素排除不及时, 毒素铅的积累也会越来越高。肾脏铅浓度的升高可能是血脑屏障和毒素代谢功能不完善造成的, 原理和血铅水平升高一样, 入大于出, 长期积累所引起的。

表 1 各组仔鼠血液和肾脏组织中铅含量比较

Table 1 Comparison of the lead content in blood and kidneys of young mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

剂量/(g/L)	血铅含量/( $\mu$ g/L)	肾脏铅含量/(ng/g)
C	20.37 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	237.82 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>
L	205.87 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	425.95 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>
M	391.64 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	511.52 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>
H	542.37 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	721.36 $\pm$ 10.36 <sup>a</sup>
F	1510299.26	1860.24
P	0.000	<0.001

注: ANOVA 与对照组比较, <sup>a</sup> $p<0.05$ (C、L、M 和 H 分别代表对照组、1.0、5.0 和 10.0 g/L 剂量组)。

### 3.2 母体铅暴露对 21 日龄仔鼠肾脏中

### MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达情况

通过 Real-time PCR 三步法对内参基因和目的基因扩增, 得到各组仔鼠 MMP-2、MMP-9 和  $\beta$ -actin 基因的扩增曲线和溶解曲线, 溶解曲线即是反映基因片段 DNA 双链在扩增过程中的具体过程, 随着温度升高 DNA 的双螺旋结构降解程度的曲线。扩增曲线是通过荧光信号对基因扩增过程进行检测。如图 1、2 和 3 所示。MMP-2 的基因溶解曲线有且只有一个最高峰, 扩增产物特异性较好, 无引物二聚体和非特异性扩增。荧光吸收图谱的 S 形曲线形状完好, 荧光定量动力学曲线基线平整, 指数区斜率较大且比较平滑, 扩增曲线比较理想。图 2 中 MMP-9 mRNA 整个扩增过程在温度范围 79~83  $^{\circ}$ C 内出现一个主峰。对照组总荧光强度在 29.52 和 30.19 循环出现激增; 染毒组 1 g/L



总荧光强度在 30.20 和 30.25 循环出现激增; 染毒组 5 g/L 总荧光强度在 31.30 和 31.21 循环出现激增; 染毒组 10 g/L 总荧光强度在 32.62 和 31.62 循环出现激增。

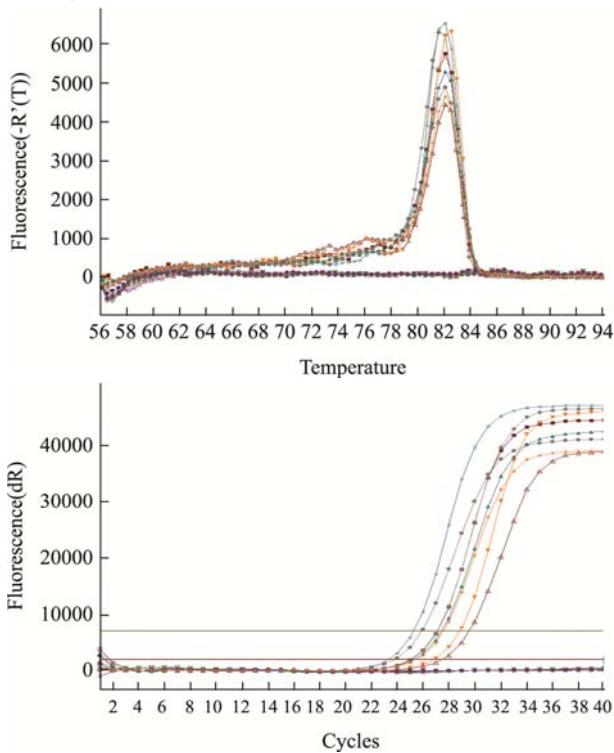


图1 MMP-2 mRNA 熔解曲线和扩增曲线

Fig.1 Dissociation curve and amplification curve of MMP-2 mRNA

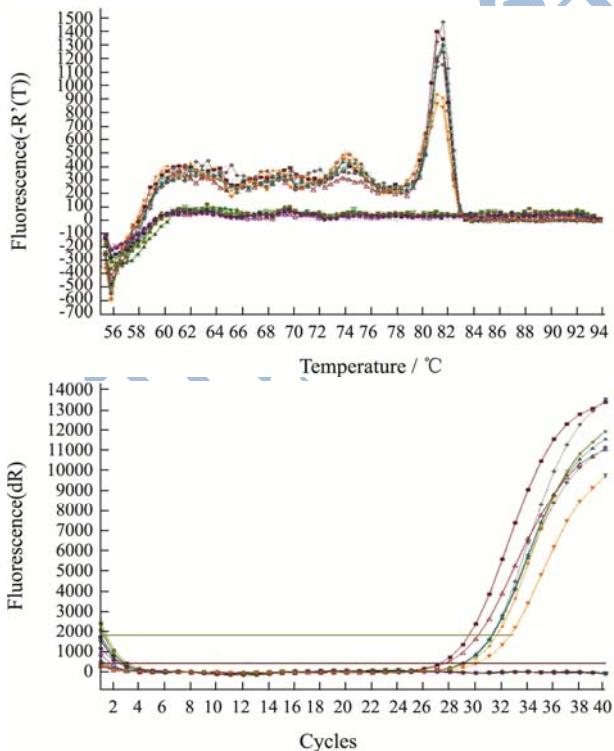


图2 MMP-9 mRNA 熔解曲线和扩增曲线

Fig.2 Dissociation curve and amplification curve of MMP-9 mRNA

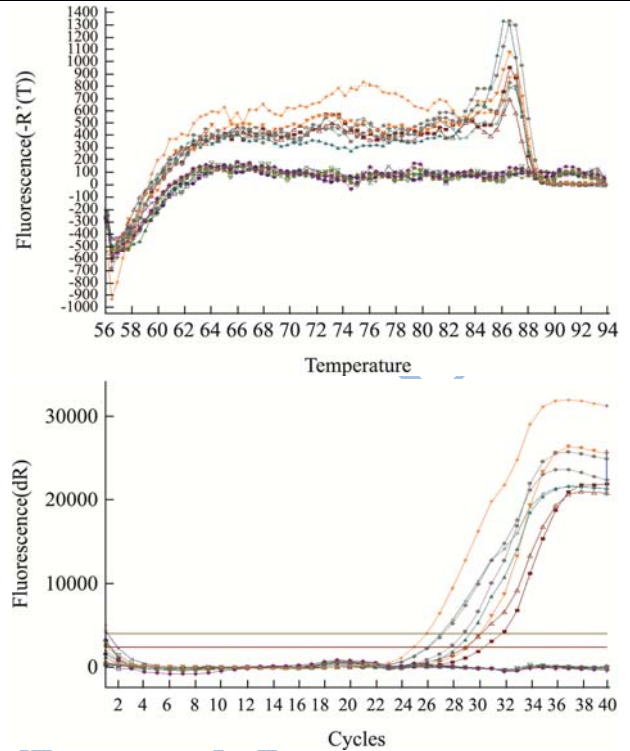


图3  $\beta$ -actin mRNA 熔解曲线和扩增曲线

Fig.3 Dissociation curve and amplification curve of  $\beta$ -actin mRNA expression

图3中  $\beta$ -actin 的熔解曲线有一主峰, 但是主峰前有杂峰出现可能原因: 有引物二聚体干扰、引物浓度不佳等。扩增曲线结果显示荧光吸收图谱的 S 形曲线形状完好, 荧光定量动力学曲线基线平整, 指数区斜率较大且比较平滑, 扩增曲线较理想。

表2 各组仔鼠肾脏组织中 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达水平

Table 2 MMP-2 and MMP-9 mRNA expression levels in the mouse kidney tissue of each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	数量	MMP-2mRNA	MMP-9mRNA
C	10	0.37±1.44	0.00±0.00 <sup>a</sup>
L	10	1.00±0.66	0.07±0.09 <sup>a</sup>
M	10	1.01±1.17	0.12±0.13 <sup>a</sup>
H	10	2.00±1.30	0.95±1.20 <sup>a</sup>
F		2.38	2.87
P		0.02	0.02

注: ANOVA分析都与对照组比较, <sup>ap</sup> $p < 0.05$ (C、L、M和H 分别代表对照组、1.0、5.0和10.0 g/L剂量组)。

表2结果显示, 在 PCR 扩增过程中, 各组仔鼠 MMP-2 的 mRNA 表达量不尽相同, 高剂量铅暴露组的 mRNA 的表达量最高, 基因表达总体差异显著, 有统计学意义。而中剂量组与高剂量组比较, 差异具有统计学意义, 高剂量组与对照组相比, 差异较显著, 具有统计学意义。与对照组相比铅暴露组仔鼠 MMP-9 mRNA 表达量明显增高, 且差异具有统计学意义

( $p < 0.05$ ), 在染毒剂量组之间随着染毒剂量增加, MMP-9 mRNA 表达量呈现递增趋势且差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ), 铅暴露 MMP-9 mRNA 表达量增长幅度与对照组相比较, 其它各染毒剂量组都依次类比较平缓, 导致这种现象的原因可能是仔鼠出生后身体在发育时期初期, 身体各项机能不太完善, 其中肾脏功能较弱, 肾脏作为身体毒素主要代谢器官, 在此阶段排泄毒素能力弱, 当毒素进入仔鼠体内后无法完全排掉, 同时仔鼠在进入半断乳时期后不仅从母乳中吸收毒素铅, 还会从饮用水中吸取一部分铅, 这样会导致铅浓度比以往增高, 且染毒量越高, 毒素排除不及时, 毒素铅的积累也会越来越高。

## 4 结论

4.1 肾脏是人体进行新陈代谢的重要器官, MMP-2 是参与 ECM 降解的一种重要的 MMPs, 研究表明, 多种肾脏疾病形成过程中都有 ECM 的堆积。近年来研究发现 ECM 增多有两方面原因, 一是 ECM 成分生成过多, 二是 ECM 降解减少, 表现为局部调控系统中 ECM 降解酶表达减少、活性降低以及降解酶的抑制物表达增加及活性增强, MMP-2 表达升高参与了 ECM 堆积导致基底膜增厚的过程。有研究发现 MMPs 与肾小球的损害有关, MMP-2 定位于肾小球, 由结缔组织细胞分泌, 主要参与 IV 型胶原的降解, 而 IV 型胶原为糖尿病肾病中基底膜增厚与系膜基质聚集的主要成分, 因此 MMP-2 的平衡态可能与糖尿病肾病密切相关<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, 随着母体孕哺期饮用铅水浓度的升高, 仔鼠体内的血铅含量也随之升高, 与此同时, MMP-2 的 mRNA 表达量也与对照组有一定的变化, 且高剂量铅暴露组的基因表达量最高。所以, 铅对仔鼠肾脏内 MMP-2 的基因表达有调控作用, 同时也会对肾脏正常的生理功能造成影响。

4.2 IV 型胶原纤维是肾小球基底膜 (BGM) 和肾小管基底膜的主要组成部分, MMPs 一般在局部组织中发挥作用, 并且受局部细胞和外来细胞分泌的细胞因子、局部微环境的调节, 正常情况分泌入血比较少, 但是在病理情况下, 如各种慢性肾小球肾炎, 各种细胞外基质成份的堆积, 肾小球的内皮细胞、肾小管上皮细胞代偿分泌 MMPs 能力会增加, 并且血液中 MMPs 的浓度也会随之升高。随着染毒组肾皮质增厚和肾小球的增大, 毛细血管扩张充血, 病变的程度也随染毒剂量的升高而加重。其中低剂量组可见肾小管上皮细胞轻度浑浊肿胀, 颗粒样变, 近些年来, 重金属的慢性肾损害问题被广泛关注, 体内的铅大部分累积在肾脏近曲小管, 浓缩沉积于近曲小管上皮细胞的铅可干

扰肾细胞的代谢, 导致结构和功能发生改变<sup>[9]</sup>。

4.3 结论指出, 随着母体孕哺期饮用铅水浓度的升高, 仔鼠体内的血铅含量也随之升高, 与此同时, MMP-2 的 mRNA 表达量也与空白对照组有一定的变化, 且高剂量铅暴露组的基因表达量最高。所以铅对仔鼠肾脏内 MMP-2 的基因表达有调控作用, 同时也会对肾脏正常的生理功能造成影响。低、中、高三个铅暴露组仔鼠的肾脏中 MMP-9 mRNA 的表达量与对照组相比都明显增高, 且随染毒剂量增加, 表达量呈递增趋势, 具有统计学意义, 可以认为母体铅暴露会引起仔鼠肾脏内 MMP-9 mRNA 的表达异常, 可能造成肾脏损伤, 并呈现一定的剂量效应关系。

## 参考文献

- [1] El-Nekeety A, El-Kady, M S Soliman, et al. Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(9): 2209-2215
- [2] Bokara K K, E Brown, R McCormick, et al. Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain [J]. Biometals, 2008, 21(1): 9-16
- [3] 蔡燕侠. 醋酸铅染毒大鼠肾脏毒性作用的研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2005  
CAI Yan-xia. Study on renal toxicity at subchronic lead exposure in rats [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2005
- [4] Wójcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, et al. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia [J]. Plos One, 2011, 6(7): e22465
- [5] Liu K, Li Z, Wu T, et al. Role of rho kinase in microvascular damage following cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. Int. J. Mol. Sci., 2011, 12(2): 1222-31
- [6] Chen R, Cui J, Xu C, et al. The significance of MMP-9 over MMP-2 in HCC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. Ann. Surg. Oncol., 2011, 10: 1245
- [7] 朱建丰, 缪英, 陈军. 石墨炉原子吸收光谱法检测血铅的方法学研究[J]. 中外医学研究, 2011, 9(24): 178-180  
ZHU Jian-feng, MIU Ying, CHEN Jun. Study on the determination of blood lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry [J]. Chinese and Foreign Medical Research, 2011, 9(24): 178-180
- [8] Kenneth J Livak, Thomas D Schmittgen. Analysis of relative

gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408

[9] Alderson N L, Chachich M E, Frizzel N, et al. Effect of antioxidants and ACE inhibition on chemical modification of proteins and progression of nephropathy in the streptozotocin diabetic rat [J]. Diabetologia, 2004, 47(8): 1385-1395

